پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۱۰ شمارهٔ۲، نیمهٔ دوم ۱۳۹۸، صفحهٔ ۳۵-۲۴
نوع مقاله: پژوهشی

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 10, No. 2, 2019, p. 24-35 (Research Article)
DOI: 10.22067/ijpr.v10i2.62582

کالوس‌زایی و باززایی از لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)با استفاده از ریزنمونه لایه نازک سلولی

عاطفه بخشیان[1] و خدیجه باقری[2]*

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، a.bakhshian@znu.ac.ir
۲- عضو هیئت علمی (استادیار) گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۶

چکیده

چالش بزرگ جهت استفاده از انتقال ژن برای اصلاح لوبیا، عدم وجـود دسـتورالعمل بهینـه بـاززایی اسـت. در ایـن تحقیق دو آزمایش برای بررسی کالوس‌زایی و باززایی لوبیا مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول، ریزنمونه‌هـای محـور جنینی شش رقم گلی، ناز، ازنا، لاین۴، لاین۸ و الیگودرز لوبیا جدا شده و در سه تیمار تنظیم‌کننده رشـد گیـاهی شـامل ترکیـــب ۱۱میکرومـــولBAP و ۰/۵۷میکرومـــولIAA، ترکیـــب ۴۴/۴میکرومـــولBAP و ۲/۲۷میکرومـــولTDZ و ۴۴/۴میکرومولBAP کشت شدند. صددرصد کالوس‌زایی در تیمار دوم در رقم‌های ناز، ازنا، لاین۸ و الیگـودرز و در تیمـار سوم در تمامی رقم‌ها به جز لاین۴ به‌دست آمد. کالوس‌ها در این آزمایش قادر به باززایی نشدند. در آزمایش دوم، بذور در دو پیش‌تیمار صفرمیکرومولTDZو ۱۰میکرومولTDZ جوانه زده و بعد از ۱۴روز، ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی عرضی به ضخامت ۰/۵-۰/۳میلی‌متر از اپی‌کوتیل جدا و به محیطMSB5 با تیمارهای ۱۰میکرومولTDZ و ۱۰میکرومـولBAP انتقال یافتند. صددرصد کالوس‌زایی با پیش‌تیمار ۱۰میکرومولTDZ و تیمار ۱۰میکرومولBAP و ۱۰میکرومولTDZ در لاین۴ و الیگودرز به‌دست آمد. بیشترین میزان باززایی (۷۷درصد) با تیمار ۱۰میکرومولTDZ در ارقام ناز، ازنـا، لایـن۸ و الیگودرز به‌دست آمد. نتایج نشان داد که ریزنمونه لایه نازک سلولی تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدTDZ وBAP بهتـر از ریزنمونه محور جنینی قادر به باززایی می باشد. همچنین تنظیم‌کننده رشدTDZ بـرای بـاززایی لوبیـا مـؤثرتر ازBAP است. تأثیر پیش‌تیمار باTDZ نیز متغیر و وابسته به ژنوتیپ است.

واژه‌های کلیدی: باززایی، کالوس‌زایی، لایه سلولی نازک لوبیا، محور جنینی

مقدمه

لوبیـا (*Phaseolus vulgaris* L.) یـک لگـوم یکسـاله و خودگرده‌افشان است که منبع اصلی پروتئین در آمریکای‌لاتـین و آفریقای شرقی محسوب می‌شـود (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007) در ایران در سال زراعی۹۴-۱۳۹۳ بیشترین مقـدار تولید حبوبات مربوط به لوبیا بـوده اسـت (آمارنامـه کشـاورزی، ۱۳۹۵). در مورد لوبیا هنـوز یـک دسـتورالعمل بهینـه بـاززایی وجود ندارد و این خود یک چالش بزرگ جهت استفاده از روش انتقال ژن برای اصلاح لوبیا محسوب می‌شـود (Veltcheva *et al.*, 2005). با وجود کاربرد فـراوان محـور جنینـی بـه عنـوان ریزنمونه برای باززایی، به نظر می‌رسـد ایـن ریزنمونـه‌هـا بـرای انتقال ژن به لوبیا مناسب نیستند. عیـب اصلـی کـاربرد چنـین ریزنمونه‌هایی برای انتقال ژن این است کـه بـاززایی معمـولاً از بافت مریسـتمی صـورت مـی‌گیـرد (Mukeshimana *et al.*, 2013) و شاخه‌های به‌دست‌آمده از مبدأ چندسلولی هستند که منجر به ایجاد گیاهچه‌های شیمر شده و انتخاب گیاهچـه‌هـای تراریخـت را مشـکل مـی‌کننـد (Angenon & Thu, 2011). روش موفقیت‌آمیزی که امروزه برای باززایی گیاهان تراریخت[3] در لوبیـا ارائـه شـده انتقـال ژن بـا آگروبـاکتریوم و اسـتفاده از بـاززایی غیرمسـتقیم مـی‌باشـد (De Dillen *et al.*, 1997 ; Clercq *et al.*, 2002 ; Zambre *et al.*, 2005). در روش غیرمستقیم ابتدا ایجاد کالوس و سپس باززایی از این کالوس‌هـا انجـام مـی‌شـود (Collado *et al.*, 2013). از ایـن رو، روش باززایی مستقیم (بدون تشکیل کالوس) با اسـتفاده از ریزنمونـه های لایه نازک سلولی کـه بـا روش‌هـای انتقـال ژن سـازگاری بهتری دارند، مورد توجه قرار گرفته است (De Carvalho *et al.*, 2000). سیسـتم لایـه نـازک سـلولی (TCL)[4] شـامل ریزنمونه‌های با اندازه‌های کوچک است که از اندام‌های مختلـف گیـاه (سـاقه، بـرگ، جنـین، پریموردیـای گـل و...) بـه‌طـور

* نویسنده مسئول: bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

[3] Transgenic
[4] Thin cell layer

طولی(lTCL)[1] و یا به‌طور عرضی (tTCL)[2] گرفته می‌شود. lTCL شامل یک نوع بافت (به‌طور مثال یک لایه از سلول‌های اپیدرمی) می‌باشد، اما tTCL با توجه به این‌که ریزنمونه به‌طور عرضی برش داده می‌شود، شامل سلول‌هایی از بافت‌های مختلف می‌باشد (Van K, 1980). در برخی منابع گفته شده که استفاده از پیش‌تیمارTDZ در محیط جوانه‌زنی بذر لوبیا موجب افزایش باززایی از ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی می شود (De Carvalho *et al*., 2000). نوع و غلظت تنظیم کننده رشد برای باززایی لوبیا بسیار مهم است. معمولاً غلظت بالایی ازBAP وTDZ لازم است تا باززایی اتفاق بیافتد (Castillo *et al*., 2015). بعد از القای باززایی، برای رشد نوساقه‌ها، کاهش غلظت سیتوکنینTDZ بعد از دو هفته از ۱۰میکرومول به ۱میکرومول لازم است. همچنین استفاده از نیترات نقره به عنوان بازدارنده ترکیبات فنولی نیز موجب بهبود رشد گیاهچه ها می‌شود (De Carvalho *et al*., 2000). هدف از این تحقیق، تعیین تأثیر پیش‌تیمار، تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی و رقم مناسب برای رسیدن به باززایی مناسب جهت استفاده در برنامه‌های مهندسی ژنتیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان در سال۹۶-۱۳۹۵ اجرا شد. مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل شش رقم لوبیا زراعی با نام‌های الیگودرز، ازنا ، ناز، گلی، لاین۴ و لاین۸ که جز لوبیاهای مورد کشت در استان زنجان بودند و از اداره مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی زنجان تهیه شدند.

آزمایش اول: کالوس‌زایی و باززایی با ریزنمونه‌های محور جنینی

این آزمایش برای تعیین تنظیم‌کننده رشد گیاهی و رقم مناسب برای کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های محور جنینی لوبیا انجام شد. آزمایش مورداستفاده، فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار بود. فاکتورهای این آزمایش عبارت بودند از: فاکتورA: شامل سه تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی شامل ۱۱میکرومولBAP و ۰/۵۷میکرومولIAA، ترکیب ۴۴/۴میکرومولBAP و ۲/۲۷میکرومولTDZ و ۴۴/۴میکرومولBAP، فاکتورB شامل شش رقم لوبیا.

برای ضدعفونی بذرها، در ابتدا چند قطره Tween-20 به آب‌مقطر اضافه کرده و بعد از مدت کوتاهی بذرها را با آب شسته و سپس در هیپوکلریت سدیم ۳درصد به‌مدت ۱۰دقیقه برای چندین‌بار تکان داده شدند و سپس چهار بار با آب‌مقطر استریل شستشو داده شدند و به‌مدت ۲۰ساعت خیس خوردند. بعد از این مدت، دوباره بذرها سه بار با آب‌مقطر استریل شسته شدند و به‌منظور خشک‌شدن بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. سپس با جداکردن پوسته بذر، لپه‌های بذر از هم جدا شده و جنین از لپه‌ها آزاد می‌شود و با حذف ریشه‌چه اولیه[3] و برگ‌های اولیه[4] محور جنینی به‌دست آمد.

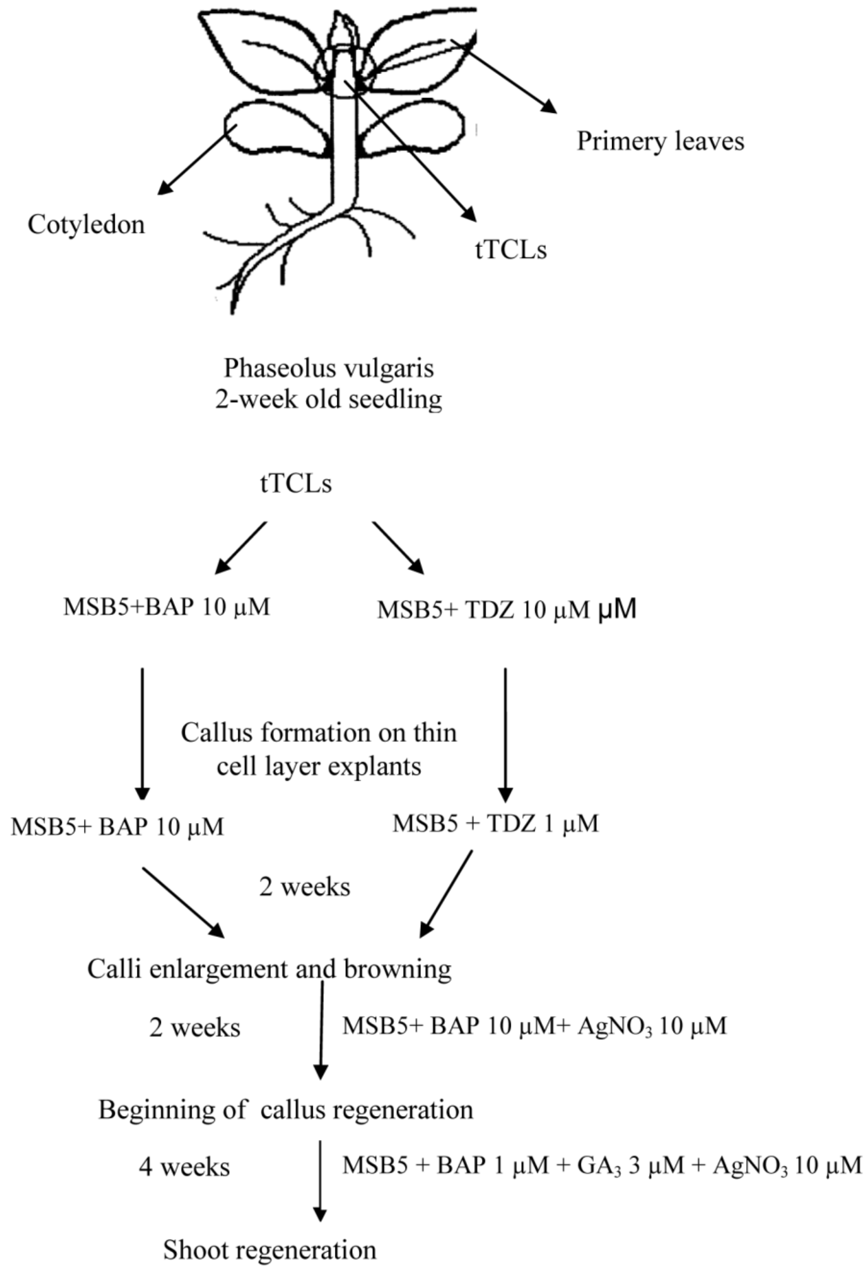
ریزنمونه‌های محور جنینی در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) و مخلوط ویتامین‌های Gamborg (1968) و با سه نوع تیمار تنظیم‌کننده رشد کشت شدند. pH محیط روی ۵/۸-۵/۷ تنظیم شد و در اتاقک رشد با دمای ۱°C±۲۵ و شرایط نوری ۱۶ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی (۱۰۰میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) قرار گرفتند. اولین تیمار شامل ۱۱میکرومولBAP و ۰/۵۷میکرومولIAA بود که در این تیمار به محیط کشت ۱۷۶/۵۹میکرومول$AgNO_3$ نیز اضافه شد و ریزنمونه‌های محور جنینی به‌مدت سه هفته در این محیط قرار گرفتند و بعد از این مدت، ریزنمونه‌ها در محیط حاوی ۴/۴۳میکرومولBAP و ۵/۷میکرومولIAAو ۱۷۶/۵۹میکرومولAgNO3 واکشت شدند و به‌مدت چهار هفته در اتاقک رشد قرار گرفتند. دومین تیمار حاوی ۴۴/۴میکرومولBAP و۲/۲۷میکرومولTDZ و سومین تیمار حاوی فقط ۴۴/۴میکرومولBAP بود که ریزنمونه‌های محور جنینی در آنها کشت شدند و به‌مدت چهار هفته در اتاقک رشد قرار گرفتند و پس از این مدت ریزنمونه‌ها به محیط تازه واکشت شدند.

آزمایش دوم: کالوس‌زایی و باززایی با ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی

این آزمایش برای تعیین تأثیر پیش‌تیمار باTDZ، تعیین تیمار تنظیم‌کننده رشد مناسب و رقم مناسب در کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی عرضی لوبیا انجام شد. آزمایش مورد استفاده به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی بود. فاکتورهای این آزمایش عبارت بودند از فاکتورA شامل پیش‌تیمار با TDZ در دو سطح صفر و ۱۰میکرومول، فاکتورB شامل تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی در دو سطح ۱۰میکرومولBAP و ۱۰میکرومولTDZ و فاکتورC شامل شش رقم لوبیا.

---

[1] Longitude Thin cell layer
[2] Transverse Thin cell layer
[3] Radicles
[4] Leaflets



شکل۱- مراحل انجام کار در کالوس‌زایی و باززایی لوبیا زراعی (*P. vulgaris*) با استفاده از ریزنمونه لایه نازک سلولی

Fig. 1. Scheme for callogenesis and regeneration from tTCLs of *P. vulgaris*

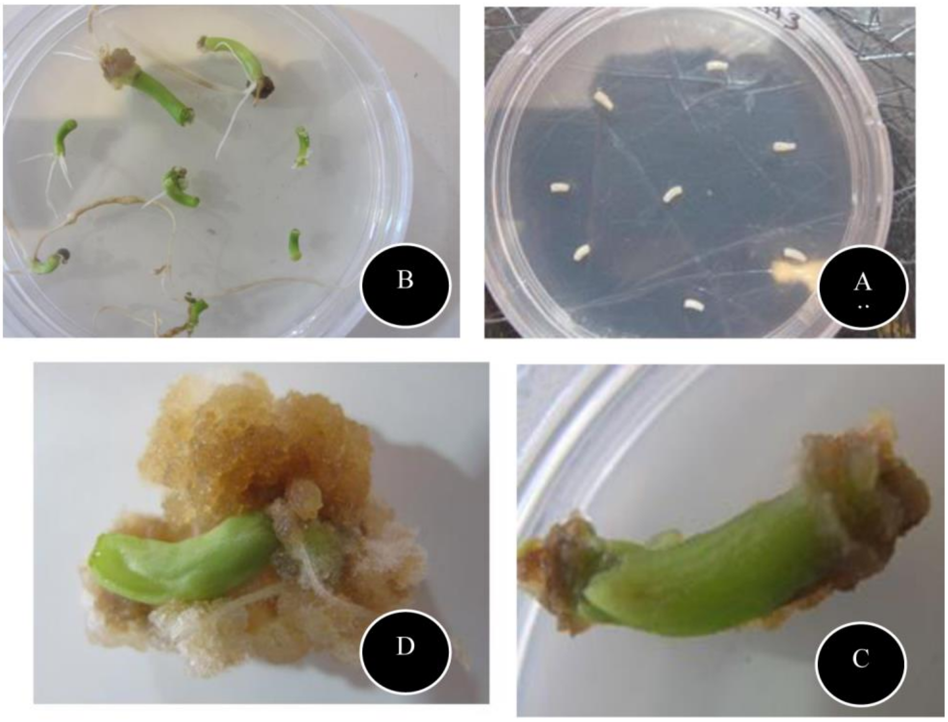
ضدعفونی بذرها مشابه با آزمایش اول انجام شد و بذرهای ضدعفونی‌شده در محیط کشت جوانه‌زنی MS ½ و تحت پیش‌تیمار با TDZ شامل محیط جوانه‌زنی با صفرمیکرومول TDZ و محیط جوانه‌زنی حاوی ۱۰میکرومول TDZ کشت شدند و به‌مدت دو هفته جوانه زدند. ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی عرضی (tTCLs) از گیاهچه‌های دو هفته‌ای از قسمت اپی‌کوتیل به ضخامت (۰/۳ تا ۰/۵میلی‌متر) جدا شدند و در محیط کشت MS و مخلوط ویتامین‌های B_5 (یک میلی‌گرم بر لیتر نیکوتینیک اسید، ۱۰میلی‌گرم بر لیتر تیامین و یک میلی‌گرم بر لیتر پیریدوکسین) و تحت تیمارهای ۱۰میکرومول BAP و ۱۰میکرومول TDZ کشت شدند و در اتاقک رشد با دمای ۲۵±۱°C و شرایط نوری ۱۶ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی (۱۰۰میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) قرار گرفتند. مراحل انجام کار و تغییرات در

محیط کشت در شکل۱ آورده شده است. در طول این دوره تعداد کالوس‌های تولیدشده توسط ریزنمونه‌ها در هر دو آزمایش و همچنین میزان باززایی در آزمایش دوم به صورت درصد یادداشت‌برداری شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار MSTATC و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار EXCEL انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های محور جنینی

اولین کالوس‌ها در ریزنمونه‌های محور جنینی در هفته چهارم مشاهده شدند. کالوس‌ها عمدتاً طلایی و زرد بودند و اکثراً حالت نرم و پفکی داشتند (شکل ۲).

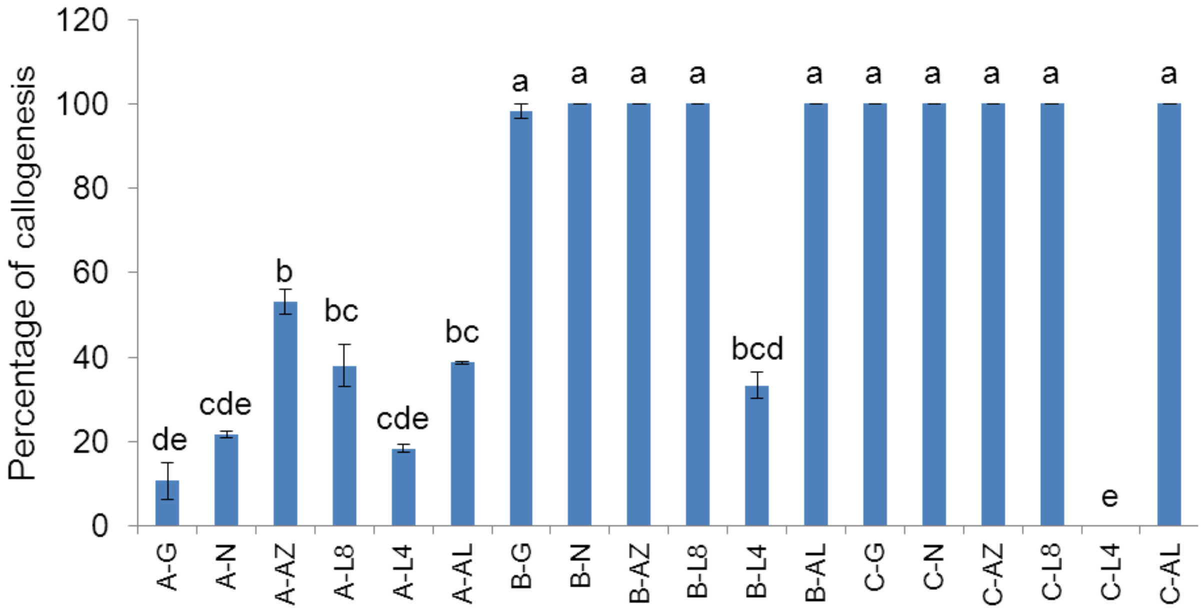


شکل ۲- مراحل مختلف کالوس‌زایی با ریزنمونه محور جنینی در لوبیا زراعی (*P. vulgaris*)؛ A) ریزنمونه‌های محور جنینی جداشده؛ B و C) تولید کالوس در هفته چهارم؛ D) کالوس‌های تولیدشده از ریزنمونه محور جنینی لوبیا

**Fig. 2. Different stages of callus formation with embryonic axis explants in common bean (*P. vulgaris*)
A. The isolated embryonic axis explants; B & C. The Callogenesis in the fourth week;
D. The calluses produced from embryonic axis explants**

جدول تجزیه واریانس، برای‌درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های محور جنینی در شش رقم لوبیا زراعی (*P. vulgaris*) نشان داد که اثرات ساده و متقابل فاکتورها در سطح یک‌درصد معنی‌دار می‌باشند. نتایج مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل نوع تیمار تنظیم‌کننده رشد و رقم نشان داد که بیشترین میزان تولید کالوس (۱۰۰درصد) مربوط به دومین تیمار حاوی ۴۴/۴میکرومول BAP و ۲/۲۷میکرومول TDZ و سومین تیمار حاوی فقط ۴۴/۴میکرومول BAP در تمامی رقم‌ها به جز لاین۴ می‌باشد (شکل ۳).

نتایج آزمایش اول نشان داد که همه ارقام (به جز لاین۴) از نظر کالوس‌زایی در تیمارهای تنظیم‌کننده مختلف، مشابه هم رفتار می‌کنند. تأثیر تیمارهای دوم و سوم بر کالوس‌زایی شش رقم تقریباً مشابه بوده است (شکل ۳).



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل نوع تنظیم‌کننده رشد و نوع رقم بر میزان کالوس‌زایی با ریزنمونه محور جنینی در شش رقم لوبیا زراعی (*P. vulgaris*)

A: تیمار ۱۱میکرومول BAP و ۰/۵۷میکرومول IAA؛ B: تیمار ۴۴/۴میکرومول BAP و ۲/۲۷میکرومول TDZ؛ C: تیمار ۴۴/۴میکرومول BAP؛
G: رقم گلی؛ N: رقم ناز؛ AZ: رقم ازنا؛ L8: لاین۸؛ L4: لاین۴؛ AL: رقم الیگودرز
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (ρ<0.01) ندارند.

Fig. 3. Mean comparison of the interaction effect of plant growth regulator type and cultivar type on callogenesis with embryonic axis explants in six common bean cultivars (*P. vulgaris*)
A: BAP (11µM)+IAA (0.57µM); B: TDZ (2.27µM) +BAP(44.4µM); C: BAP (44.4µM);
G: Goli cultivar; N: Naz cultivar; AZ: Azna cultivar; L8: Line 8; L4: Line 4; AL: Aligoodarz cultivar
Means with the same letter are not significantly different (ρ<0.05).

در ریزنمونه محور جنینی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدBAP وTDZ بر کالوس‌زایی بسیار بهتر از ترکیبIAA و BAP بوده است. کمترین میزان کالوس‌زایی در هر سه تیمار در لاین۴ مشاهده شد.

در مطالعات Mukeshimana *et al*, (2013) و Sabzikar *et al*, (2010) تیمارهای تنظیم‌کننده رشد مشابه، منجر به باززایی نیز شده‌اند که در این مطالعه منجر به باززایی نشد که این نتیجه می‌تواند ناشی از اثر متقابل رقم و تنظیم‌کننده رشد باشد که در جدول تجزیه واریانس معنی‌دار شده و این مفهوم را دارد که تنظیم‌کننده رشد مشابه، بر ارقام مختلف تأثیرهای متفاوت می‌توانند داشته باشند.

کالوس‌زایی ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی

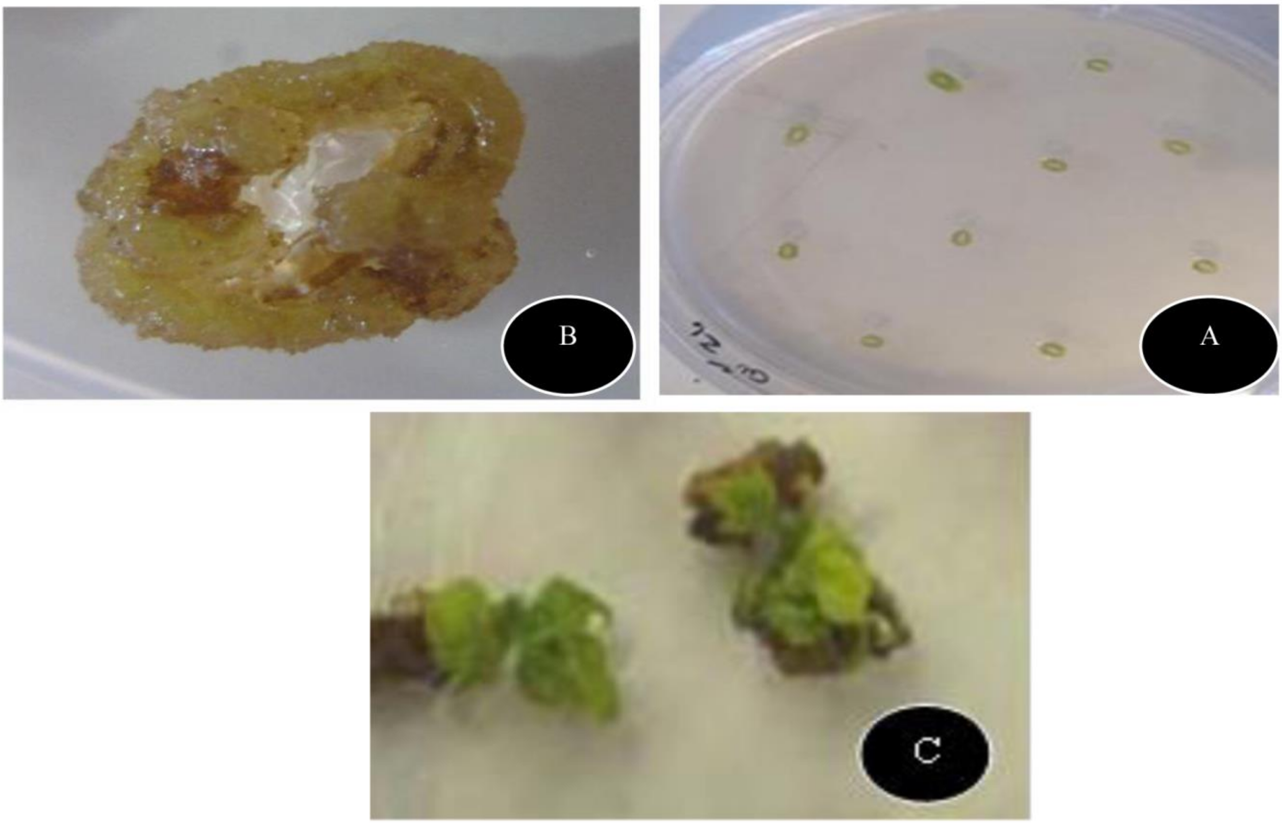
اولین کالوس‌ها در اواخر هفته دوم در ریزنمونه‌های لایۀ نازک سلولی مشاهده شد. کالوس‌ها در مدت دو تا چهار هفته از قرارگرفتن در محیط کشت حاوی سیتوکینین (TDZ وBAP) تشکیل شدند (شکل 4B). کالوس‌های تشکیل‌شده به لحاظ ظاهری تفاوتی با یکدیگر نداشتند. در روند شکل‌گیری این کالوس‌ها ابتدا در تمام سطح ریزنمونه، کالوس‌های نرم و آبدار شفاف تشکیل شده و سپس با رشد تدریجی کالوس‌ها حالت سخت‌تری پیدا کردند. در محیط کالوس‌زایی برخی از کالوس‌ها بعد از مدتی به رنگ تیره و قهوه‌ای درآمدند که با استفاده از نیترات نقره این مشکل تا حد زیادی برطرف شد.

در بررسی جدول تجزیه واریانس‌درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی در شش رقم لوبیا زراعی (*P. vulgaris*) مشخص شد که اثرات ساده (به جز نوع پیش تیمار A) و اثرات متقابل فاکتورها در سطح یک‌درصد معنی‌دار بودند (جدول۲). با بررسی مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر متقابل نوع پیش‌تیمار (A) و نوع تنظیم‌کننده رشد (B) و نوع رقم (C) مشخص شد که بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به پیش‌تیمار ۱۰میکرومولTDZ، تیمار ۱۰میکرومولBAP و ۱۰میکرومولTDZدر لاین۴ و الیگودرز می‌باشد (شکل ۵).

در مورد تأثیر پیش‌تیمارTDZ مشاهده شده است که در برخی ارقام مثل لاین۴ و الیگودرز این تأثیر مثبت بوده، ولی در برخی ارقام مثل گلی، ناز و ازنا این تأثیر نه‌تنها مثبت نبوده بلکه موجب کاهش کالوس‌زایی نیز شده است. این نتیجه با توجه به معنی‌داربودن اثرمتقابل پیش‌تیمار در رقم قابل‌توجیه است.

بررسی نتایج باززایی در ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی

کالوس‌ها اولین نشانه‌های باززایی را در هفته پنجم و ششم نشان دادند. در بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس، درصد باززایی در ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی در شش رقم لوبیا زراعی (*P. vulgaris*) مشخص شد که اثرات ساده (به‌جز نوع پیش‌تیمار) و اثرات متقابل (به‌جز اثر متقابل سه‌طرفه نوع پیش‌تیمار در تنظیم‌کننده رشد در نوع رقم) بر میزان باززایی در سطح یک‌درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). با بررسی مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر متقابل نوع پیش‌تیمار (A) و نوع رقم (C) بیشترین میزان باززایی مربوط به پیش‌تیمار ۱۰میکرومولTDZ در رقم ازنا (شکل ۵) و در اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد (B) و رقم (C) مشخص شد که بیشترین میزان باززایی مربوط به تیمار ۱۰میکرومولTDZ در رقم ازنا می‌باشد (شکل ۶).



شکل ۴- مراحل کالوس‌زایی و باززایی با ریزنمونه لایه نازک سلولی در لوبیا زراعی (*P. vulgaris*)

A) ریزنمونه‌های لایهٔ نازک سلولی جداشده از قسمت اپی‌کوتیل؛ B) کالوس تولیدشده در محیط حاوی ۱۰میکرومولBAP و ۱۰میکرومولTDZ؛ C) باززایی گیاهچه‌ها از کالوس‌ها

Fig. 4. Different stages of callogenesis and regeneration with tTCLs explants in common bean (*P. vulgaris*)

A) The isolated thin cell layer explants from epicotyl; B) Callogenesis in medium supplemented ofTDZ (10µM), BAP (10µM); C) Shoot regeneration from callus

جدول ۲- تجزیه واریانس‌درصد کالوس‌زایی و باززایی با ریزنمونه لایه نازک سلولی در شش رقم لوبیا زراعی (*P. vulgaris*)

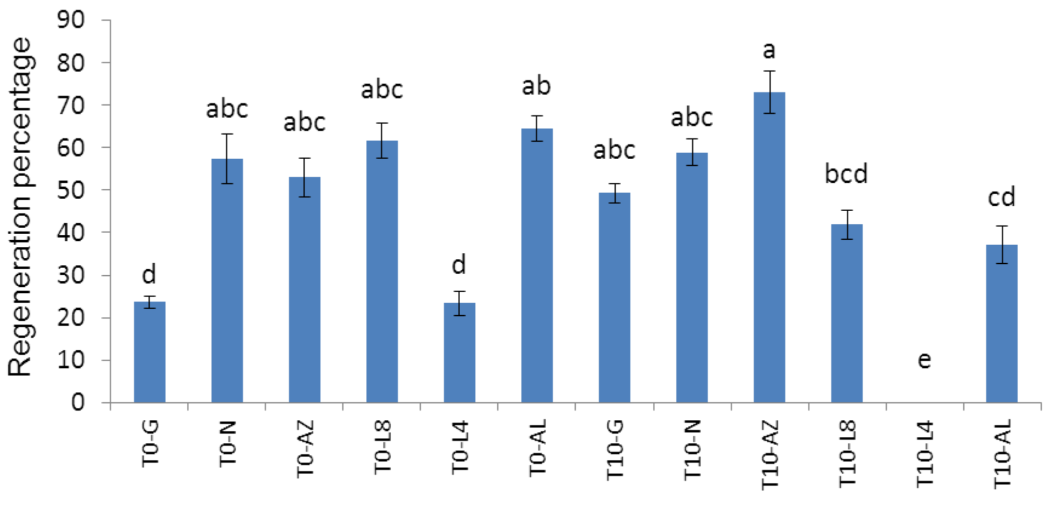
Table 2. Anova analysis table of callogenesis and regeneration percentage with tTCLs explants in six common bean cultivar (*P. vulgaris*)

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean squares درصد کالوس‌زایی Callogenesis percentage	 درصد باززایی Regeneration percentage
پیش‌تیمار (فاکتور A) Pretreatment (A)	1	128.000 ns	272.222 ns
تیمار تنظیم‌کننده رشد (فاکتور B) P.G.R treatment (B)	1	5168.056**	16989.389**
اثر متقابل پیش‌تیمار و تنظیم‌کننده رشد (A×B) Pretreatment × P.G.R interaction (A×B)	1	4933.556**	3813.556**
رقم (فاکتور C) Cultivar (C)	5	8615.822**	4218.156**
اثر متقابل پیش‌تیمار و رقم (A×C) Pretreatment × Cultivar interaction (A×C)	5	1445.033**	1593.122**
اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد و رقم (B×C) P.G.R × Cultivar interaction (B×C)	5	1057.756**	1575.956**
اثر متقابل پیش‌تیمار و تنظیم‌کننده رشد و رقم (A×B×C) Pretreatment × P.G.R × Cultivar interaction (A×B×C)	5	913.189**	696.789ns
خطا Error	48	218.958	352.833

P.G.R: Plant Growth Regulator

*،** و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد و ۱درصد و غیرمعنی‌دار

*, ** and ns: Significant at 5% and 1% probability level, non significant respectively



شکل ۵- اثر متقابل نوع پیش‌تیمار و نوع رقم بر میزان باززایی با ریزنمونه لایه نازک سلولی در شش رقم لوبیا زراعی (*P. vulgaris*)

T0: پیش‌تیمار صفر میکرومولTDZ؛ T10: پیش‌تیمار ۱۰میکرومولTDZ؛ G: رقم گلی؛ N: رقم ناز؛ AZ: رقم ازنا؛ L8: لاین۸؛ L4: لاین۴؛ AL: رقم الیگودرز

میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (ρ<0.05) ندارند.

Fig. 5. Interactive effect of pretreatment type and cultivar type on regeneration with tTCLs explants in six common bean cultivars (*P. vulgaris*)

T0 :Pretreatment 0 µMTDZ; T10 :Pretreatment 10 µMTDZ; G: Goli cultivar; N: Naz cultivar; AZ: Azna cultivar; L8: Line 8; L4: Line 4; AL: Aligoodarz cultivar

Means with the same letter are not significantly different (ρ<0.05).

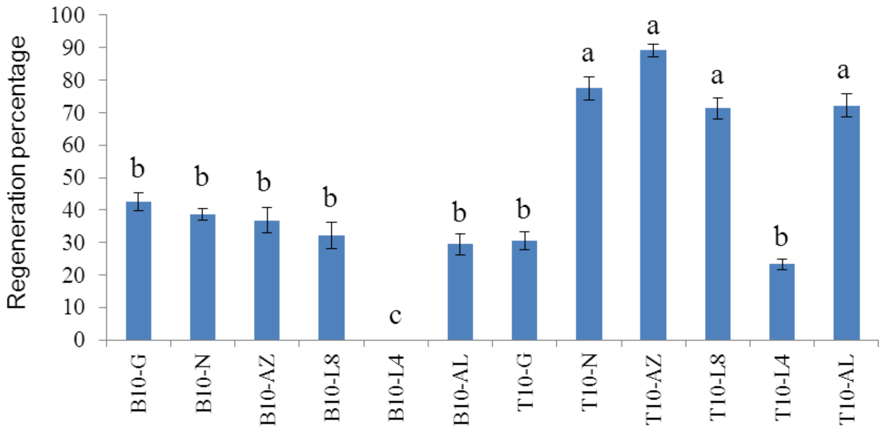
جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع پیش‌تیمار و نوع تنظیم‌کننده رشد و نوع رقم بر میزان کالوس‌زایی با ریزنمونه لایه نازک سلولی در شش رقم لوبیا زراعی (*P. vulgaris*)

Table 3. Mean comparison of the interaction effect of pretreatment type, plant growth regulator treatment and cultivar on callogenesis with tTCLs explants in six common bean cultivars (*P. vulgaris*)

پیش‌تیمار Pretreatment	تیمار تنظیم‌کننده رشد Plant growth regulator	رقم Cultivar	میانگین‌درصد کالوس‌زایی Average callogenesis percentage
TDZ-0	BAP-10	G	$69.7^{cd} \pm 5.100$
TDZ-0	BAP-10	N	$72.60^{bcd} \pm 1.45$
TDZ-0	BAP-10	AZ	$24^{efghi} \pm 4.06$
TDZ-0	BAP-10	L8	$34.60^{efgh} \pm 1.45$
TDZ-0	BAP-10	L4	$97^{ab} \pm 1.730$
TDZ-0	BAP-10	AL	$45.50^{def} \pm 4$
TDZ-0	TDZ-10	G	$50.60^{de} \pm 5.37$
TDZ-0	TDZ-10	N	$7.33^{hi} \pm 4.05$
TDZ-0	TDZ-10	AZ	$10^{ghi} \pm 2.30$
TDZ-0	TDZ-10	L8	$4.67^{i} \pm 2.60$
TDZ-0	TDZ-10	L4	$52.33^{de} \pm 4.60$
TDZ-0	TDZ-10	AL	$17.66^{fghi} \pm 3.30$
TDZ-10	BAP-10	G	$26.25^{efghi} \pm 2.50$
TDZ-10	BAP-10	N	$37. 67^{efg} \pm 3.52$
TDZ-10	BAP-10	AZ	$0^{i} \pm 0$
TDZ-10	BAP-10	L8	$8.00^{hi} \pm 3.00$
TDZ-10	BAP-10	L4	$100^{a} \pm 0$
TDZ-10	BAP-10	AL	$88^{abc} \pm 4.04$
TDZ-10	TDZ-10	G	$45^{def} \pm 4.81$
TDZ-10	TDZ-10	N	$33.20^{efgh} \pm 5.5$
TDZ-10	TDZ-10	AZ	$0^{i} \pm 0$
TDZ-10	TDZ-10	L8	$46.40^{de} \pm 2.72$
TDZ-10	TDZ-10	L4	$100^{a} \pm 0$
TDZ-10	TDZ-10	AL	$33.05^{efgh} \pm 2.75$

TDZ-0: پیش‌تیمار صفرمیکرومولTDZ؛ TDZ-10: پیش‌تیمار حاوی ۱۰میکرومولTDZ؛ BAP-10: تیمار ۱۰میکرومولBAP؛
TDZ-10: تیمار ۱۰میکرومولTDZ؛ G: رقم گلی؛ N: رقم ناز؛ AZ: رقم ازنا؛ L8: لاین۸؛ L4: لاین۴؛ AL: رقم الیگودرز
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (ρ<0.05) ندارند.

TDZ-0 :Pretreatment 0 µMTDZ; TDZ-10 :Pretreatment 10 µMTDZ; BAP-10: Treatment 10 µMBAP; TDZ-10: Treatment 10µMTDZ;
G: Goli cultivar; N: Naz cultivar; AZ: Azna cultivar; L8: Line 8; L4: Line 4; AL: Aligoodarz cultivar
Means with the same letter are not significantly different (ρ<0.05).



شکل ۶- اثر متقابل نوع تنظیم‌کننده رشد و نوع رقم بر میزان باززایی با ریزنمونه لایه نازک سلولی در شش رقم لوبیا زراعی (*P. vulgaris*)

B10: تیمار ۱۰میکرومولBAP؛ T10: تیمار ۱۰میکرومولTDZ؛ G: رقم گلی؛ N: رقم ناز؛ AZ: رقم ازنا؛ L8: لاین۸؛ L4: لاین۴؛ AL: رقم الیگودرز
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (ρ<0.05) ندارند.

Fig. 6. Interaction effect of plant growth regulator treatment and cultivar on regeneration with tTCLs explants in six common bean cultivars (*P. vulgaris*)

B10: Treatment 10 µMBAP; T10: Treatment 10µMTDZ; G: Goli cultivar; N: Naz cultivar; AZ: Azna cultivar;
L8: Line 8; L4: Line 4; AL: Aligoodarz cultivar
Means with the same letter are not significantly different (ρ<0.05).

لاین۴ باوجود کالوس‌زایی خوب، در باززایی ضعیف عمل کرد. رقم الیگودرز هم در کالوس‌زایی و هم در باززایی نتیجه بهتری نشان داد، بنابراین می‌توان این رقم را به عنوان رقم مناسب از بین شش رقم معرفی کرد.

در مطالعه‌ای که توسط De Carvalho *et al*, (2000) انجام شد، تیمارهای تنظیم‌کننده رشد مشابه با استفاده از ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی منجر به باززایی مستقیم شده بود؛ ولی نتایج ما نشان داد که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینین منجر به باززایی مستقیم ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی در ارقام مورد مطالعه نشد؛ بلکه ابتدا القای کالوس اتفاق افتاد. زمانی که ریزنمونه‌ها به‌مدت طولانی (بیش از دو هفته) در معرض غلظت بالای سیتوکنین قرار می‌گیرند، از رشد نوساقه‌ها ممانعت به عمل می‌آید و با کاهش غلظت سیتوکنین باززایی اتفاق می‌افتد. این نتیجه با یافته‌های Malik *et al*, (1992) و Capelle *et al*, (1983) مطابقت دارد که نشان دادند نیازی به قرارگیری مداوم در معرضTDZ پس از اینکه کشت‌ها به سیتوکینین واکنش نشان دادند، نیست. همچنین اثر بازدارندگیTDZ در غلظت بالا تحت تیمار طولانی مدت در ایجاد ساقه و ریشه بیان شده است. این شاید به این دلیل باشد که TDZ نسبت به دیگر سیتوکینین‌های مصنوعی کمتر تحت تخریب آنزیمی گیاه قرار می‌گیرد و همچنین گفته شده است که ممکن است TDZ در سنتز و یا تجمع سیتوکینین‌ها در کشت بافت دخیل باشد (Thomas & Katterman, 1986).

در مقایسه تأثیر نوع ریزنمونه، نتیجه جالب در مورد تأثیر اثر متقابل نوع ریزنمونه و رقم در لاین۴ مشاهده شد، به‌طوری که در ریزنمونه لایه نازک سلولی بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به لاین۴ بود، درحالی‌که در ریزنمونه محور جنینی کمترین درصد کالوس‌زایی مربوط به لاین۴ بود. در مورد رقم ازنا این نتیجه برعکس بود؛ یعنی در ریزنمونه لایه نازک سلولی کمترین درصد کالوس‌زایی مربوط به رقم ازنا بود، درحالی‌که در ریزنمونه محور جنینی بالاترین درصد کالوس‌زایی را داشته است.

نتایج این مطالعه نشان داد که ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی عرضی اپی‌کوتیل بهتر از ریزنمونه محور جنینی قادر به باززایی هستند. ریزنمونهTCL برای باززایی گیاهان مختلفی از جمله لگوم‌ها (Van *et al*., 1986)، دولپه‌ها (Van Le *et al*., 1998) و تک‌لپه‌ها (Lakshmanan *et al*., 1995; Nhut *et al*., 2001) استفاده شده است. ریزنمونه‌های TCL فراوانی بالای تشکیل شاخه و باززایی گیاه را میسر می‌سازد و همچنین کاهش زمان موردنیاز برای تمایز جوانه که در صورت استفاده از سیستم TCL این زمان دو هفته در غیر این صورت به هفت تا هشت هفته افزایش می‌یابد.

در هر دو آزمایش تأثیر مثبت نیترات نقره بر کاهش ترکیبات فنولیک و جلوگیری از قهوه‌ای‌شدن کالوس‌ها مشاهده شد. بر طبق نتایج مطالعات قبلی اضافه‌کردن نیترات نقره هم اندازه با غلظتBAP علاوه بر کاهش ترکیبات فنولیک باعث افزایش معنی‌دار در رشد تعداد نوساقه‌ها می‌شود، ولی در مطالعه حاضر این نتیجه به‌طور ضعیف مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی از بین شش رقم مورد مطالعه، رقم الیگودرز، از بین دو ریزنمونه، ریزنمونه لایه نازک سلولی عرضی و از بین پیش‌تیمارها، پیش‌تیمارTDZ با غلظت ۱۰میکرومول و از بین تیمارهای تنظیم‌کننده رشد، TDZ با غلظت ۱۰میکرومول را توصیه کرد.

همان‌طورکه قبلاً گفته شد، در مورد لوبیا هنوز یک سیستم بهینه باززایی فراگیر که قابل استفاده برای ارقام مختلف باشد، وجود ندارد. یکی از دلایل این مشکل می‌تواند ناشی از تأثیرپذیری بالای کالوس‌زایی و باززایی از ژنوتیپ ارقام باشد. همین مسئله موجب می‌شود که نتایج مطالعات تکرارپذیری نداشته باشند و دستورالعمل‌های ارائه‌شده حالت بهینه و فراگیر پیدا نمی‌کنند.

منابع

1. Angenon, G., and Thu, T. 2011. Genetic Transformation. In: A. Pratap and J. Kumar (Eds). Biology and Breeding of Food Legumes. CABI., UK, p. 178-192.
2. Capelle, S.C., Mok, D.W., Kirchner, S.C., and Mok, M.C. 1983. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N6-(Δ2-Isopentenyl)[8-14C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiology 73(3): 796-802.
3. Castillo, B.M., Rodríguez de la O, J.L., Gallardo, J.O.M and Iturriaga, G. 2015. In vitro plants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) obtained by direct organogenesis. Journal of Agricultural Science 7(11): 169-179.

4. Collado, R., Veitia, N., Bermudez-Caraballoso, I., Garcia, L., Torres, D., Romero, C., Lorenzo, J.R., and Angenon, G. 2013. Efficient in vitro plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. Scientia Horticulturae 153: 109-116.

5. De Carvalho, M.H.C., Van Le, B., Zuily-Fodil, Y., Thi, A.T.P., and Van, K.T.T. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. Plant Science 159(2): 223-232.

6. De Clercq, J., Zambre, M., Van Montagu, M., Dillen, W., and Angenon, G. 2002. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Plant Cell Reports 21(4): 333-340.

7. Dillen, W., De Clercq, J., Goossens, A., Van Montagu, M., and Angenon, G. 1997. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Theoretical and Applied Genetics 94(2): 151-158.

8. Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J., Guille´n, G., Dı´az-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P.M., and Sanchez, F. 2007. Fast, efficient and reproducible genetictransformation of *Phaseolus* spp. by *agrobacterium* rhizogenes. Nature Protocols 2(7): 1819-1824.

9. Gamborg, O.L.C., Miller, R.A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50(1)**:** 151-158.

10. Lakshmanan, P., Loh, C.S., and Goh, C.J. 1995. An in vitro method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid Aranda Deborah using thin section culture. Plant Cell Reports 14(8): 510-514.

11. Malik, K.A., and Saxena, P.K. 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta 186(3): 384-389.

12. Ministry of Agriculture Jahad. 2016. Amarnameh Keshavarzi. Available at web site http://amar.maj.ir/Portal/Home/Default.aspx?CategoryID=117564e0-507c-4565-9659fbabfb4acb9b. (In Persian).

13. Mukeshimana, G., Ma, Y., Walworth, A.E., Song, G.Q., and Kelly, J.D. 2013. Factors influencing regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Biotechnology Reports 7(1): 59-70.

14. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.

15. Nhut, D.T., Van Le, B., Tanaka, M., and Van, K.T.T. 2001. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissues of *Lilium longiflorum*. Scientia Horticulturae 87(1): 131-138.

16. Sabzikar, R., Sticklen, M.B., and Kelly, J.D. 2010. In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 100(1): 97-105.

17. Thomas, J.C., and Katterman, F.R. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. Plant Physiology 81(2): 681-683.

18. Van K, T.T. 1980. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers [Plants, de novo buds, roots]. International Review of Cytology 32: 291-311.

19.Van, K.T.T., Lie-Schricke, H., Marcotte, J., and Trinh, T. 1986. Winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.]. In: Y.P.S. Bajaj (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 2. Crop I. Springer-Verlag, Berlin, p. 556-567.

20.Van Le, B., Jeanneau, M., Sadik, S., Tu, S., Vidal, J., and Van, K.T.T. 1998. Rapid plant regeneration on a C4 dicot species: *Amaranthus edulis*. Plant Science 132(1): 145-154.

21.Veltcheva, M., Svetleva, D., Petkova, S., and Perl, A. 2005. In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) problems and progress. Scientia Horticulturae 107(1): 2-10.

22. Zambre, M., Goossens, A., Cardona, C., Van Montagu, M., Terryn, N., and Angenon, G. 2005. A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepary bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the mexican bean weevil. Theoretical and Applied Genetics 110(5): 914-924.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 10, No. 2, 2019, p. 24-35 (Research Article)

Callogenesis and regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using thin cell layer explants

Bakhshian[1], A. & Bagheri[2]*, Kh.

1. MSc. Student of Agriculture Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, a.bakhshian@znu.ac.ir
2. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

Received: 7 March 2017
Accepted: 17 December 2017

DOI: 10.22067/ijpr.v10i2.62582

Introduction

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important species of the legume. This plant is a very important source of vegetable protein, especially in those regions of the world in which animal proteins are scarce. However, breeding can not add certain genes that do not exist naturally in the *P. vulgaris* gene pool. Due to this limitation of plant breeding, new trait improvement approaches such as interspecific horizontal gene transfer via genetic engineering need to be utilized in order to complement the limitations encountered by conventional breeding of this crop. Still, there is not an optimized protocol for beans regeneration and this is a big challenge for bean breeding through genetic engineering

Material & Methods

In this study, two experiments were conducted to evaluate callus induction and regeneration in bean. Seeds of *P. vulgaris* were washed thoroughly with distilled water and tween-20 (10%). Subsequently they were surface sterilized with 70% ethanol for 2 min followed by sodium hypochloride (3%) for 15 min. After five rinses with sterile distilled water, they were allowed to germinate aseptically on half strength Murashige and Skoog (MS) medium. In the first experiment, induction of callus and regeneration were investigated in six common bean cultivars with embryonic axis explants under the influence of TDZ, BAP and IAA plant growth regulators. The sterile seeds were soaked for 20 hours, embryogenic axes were isolated from seeds and cultured on MS medium with different growth regulators including BAP (11µM) and IAA (0/57µM), BAP (44/4µM) and TDZ (2/27µM), BAP (44/4µM)**.** In the second experiment, sterile seeds germinated under the pretreatments medium (free TDZ, 10µM TDZ) and then, after 14 days, Transverse thin cell layer explants (with 0.3-0.5 mm thick) were excised from epicotyls. For induction of regeneration, explants were transferred to solid MS medium supplemented with 20 g/lit sucrose, B5 vitamins and 10µM TDZ or 10µM BAP. After 14 days, TDZ concentration reduced to 1µM in the TDZ (10µM) treatment and BAP (10µM) treatment remained intact. After 28 days, all samples were transferred to medium MSB5+ BAP (10µM) + $AgNO_3$ (10 µM). After 48 days, all samples were transferred to MSB5+ BAP (1µM) + GA_3 (3 µM) + $AgNO_3$ (10 µM) and after 62 days, all samples were transferred to MSB5+ NAA (1µM) + $AgNO_3$ (10 µM). During this period the callogenesis and regeneration rate were recorded.

Results & Discussion

The results of first experiment showed that the highest callus production (100%) related to BAP (44/4µM) + TDZ (2/27µM) and BAP (44/4µM) treatments in all cultivars except Line 4. Based on the results, callus induction in all varieties (except Line 4) were same in various growth regulator treatments. In embryogenic axes explant, the effect of BAP and TDZ on callus induction was much better than IAA. Second experiment data showed that most callus induction in the pretreatment of the seedlings by TDZ (10µM), treatment by TDZ (10µM) and BAP (10µM) in Line 4 cultivar and Aligudarz was in next rank. Most regeneration achieved in the pretreatment TDZ (10µM) and treatment by TDZ (10µM) in Azna, Naz, Line 8 and Aligudarz cultivars. The regeneration of Line 4 was weak despite the good callogenesis. From

***Corresponding Author:** bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

the 6 cultivars, Aligudarz showed better results in callogenesis and regeneration. It can be concluded that TDZ is better than BAP for regeneration in tTCLS explants of bean. In both experiments, the positive effect of silver nitrate on the reduction of phenolic compounds were observed. Based on previous studies, the combination of BAP and AgNO3 at the same concentrations(10µM) significantly raised the number of developed shoots, but unfortunately in our study the same result was not observed and the effect of $AgNO_3$ on shoot development was weak.

Conclusion

Unlike previous studies, cytokinin used in this study, did not lead to direct regeneration of bean. The results showed that high concentrations of the cytokinin is lead to callus induction in tested varieties. It was observed that a prolonged exposure to high TDZ concentration had an inhibitory effect on further development of shoots and by reducing the concentrations of TDZ, regeneration will occur. The results also showed that transverse thin cell layers explants from epicotyl are able to regenerate under the influence of TDZ and BAP better than embryonic axis explants. Regeneration severely is affected by genotype, maybe that's why still, there is not an optimized protocol for bean regeneration.

Keywords: Callogenesis, Embryonic axis, *Phaseolus vulgaris*, Regeneration, Thin Cell Layer